

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEIS
Internationales Bu
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHUNG
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM



WO 9606909A2

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C11D 3/386, C12N 9/02</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/06909 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1996 (07.03.96)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03342 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. August 1995 (23.08.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 30 327.0 27. August 1994 (27.08.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US): DE-GUSSA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Weissfrauenstrasse 9, D-60311 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VAN PEE, Karl-Heinz [DE/DE]; Lipsiusstrasse 12, D-01309 Dresden (DE). HECHT, Hans-Jürgen [DE/DE]; Erlenkamp 25, D-38126 Braunschweig (DE). BERKESSEL, Albrecht [DE/DE]; Friedrichsfelder Strasse 11a, D-68535 Edingen (DE). SCHRAPEL, Thomas [DE/DE]; Südring 9, D-37120 Bovenden (DE). LAATSCH, Hartmut [DE/DE]; Adolf-Ellissen-Weg 21, D-37077 Göttingen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SI, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: ENZYMATIC, ACTIVE OXYGEN-RELEASING MIXTURE AND PERACID PRODUCTION (54) Bezeichnung: ENZYMATISCHE, AKTIVEN SAUERSTOFF LIEFERNDE MISCHUNG SOWIE HERSTELLUNG VON PERSÄUREN (57) Abstract Enzymatic, active oxygen-releasing mixtures may be used as oxidising agents for preparing chemical compounds and in bleaching, washing, cleaning and disinfecting agents. According to the invention the mixture contains oxidoreductase with an α/β-hydrolase fold and a catalytic triad consisting of aminoacids serine, histidine and aspartic acid, a peroxide source, and an aqueous solution of an organic acid or its salt. In order to produce organic peroxides, organic acids or their salts in an aqueous solution are converted into organic peroxides in the presence of oxidoreductase with an α/β-hydrolase fold and a catalytic triad consisting of aminoacids serine, histidine and aspartic acid, and hydrogen peroxide or peroxide compounds, at a pH value from 3.5 to 6.0 and temperatures from 15 to 80 °C. (57) Zusammenfassung Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischungen können Anwendung als Oxidationsmittel zur Herstellung chemischer Verbindungen sowie in Bleich-, Wasch-, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln finden. Erfindungsgemäß besteht die Mischung aus Oxidoreduktase mit einer α/β-Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure, einer Peroxidquelle, einer wässrigen Lösung einer organischen Säure oder deren Salz. Die Herstellung organischer Persäuren erfolgt erfindungsgemäß derart, daß in Anwesenheit von Oxidoreduktase mit einer α/β-Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure und Wasserstoffperoxid oder Peroxidverbindungen organische Säuren oder deren Salze in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen 15 und 80 °C zu organischen Persäuren umgewandelt werden.</p>		

752956

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung sowie
Herstellung von Persäuren

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft eine enzymatische, aktiven
Sauerstoff liefernde Mischung sowie ein Verfahren zur
enzymatischen Herstellung von Persäuren. Enzymatische,
aktiven Sauerstoff liefernde Mischungen finden Anwendung
bei Oxidationsreaktionen zur Herstellung chemischer
10 Verbindungen. Derartige Mischungen sind aber auch als
oxidative Bleichmittel in Waschmittelzusammensetzungen
wirksam. Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere
bei der Synthese organischer Verbindungen anwendbar, bei
denen die in situ gebildete Persäure als oxidierender
15 Reaktionspartner teilnimmt.

- Bekannt ist die chemische Persäureherstellung, die über die
Umsetzung von Säureanhydriden und Säurehalogeniden mit
Wasserstoffperoxid erfolgt. Technisch lassen sich Persäuren
aus Carbonsäuren und Wasserstoffperoxid in Gegenwart von
20 Mineralsäuren herstellen. Die Persäuren sind
außerordentlich instabil. Bei Erhitzen können derartige
Verbindungen ohne Vorwarnung explodieren.

- Auch wenn die hohe Reaktivität organischer Persäuren
bekannt und für viele chemische Reaktionen von Vorteil
25 ist, fanden bislang im wesentlichen Natriumperborate als
Bleichmittel in Waschmitteln Anwendung. Aus der US-PS
5,296,161 ist ein Verfahren bekannt, das ausgehend von der
enzymatischen Aktivität von Esterasen - katalytisch Ester
zu verseifen - diese Wirkung nutzt, um organische Persäuren
30 in Lösung herzustellen und deren sauerstoffbildende
Aktivität beispielsweise für Bleichprozesse zu nutzen.
Dabei werden in Gegenwart von Esterasen und Lipasen
Fettsäureester definierter Struktur enzymatisch unter

- Bildung von Persäuren gespalten. Aufgrund der Anwendung von Fettsäureestern erfordern derartige Systeme jedoch zusätzliche Emulgatoren, um das System in Lösung bzw. Suspension zu halten und dadurch die enzymatische Reaktion zu ermöglichen. "nabhängig dessen, daß bei diesem System nach Verbrauch bzw. Reaktion der Reaktionskomponenten ökologisch schwer abbaubare Produkte entstehen können, setzt dieses System zunächst eine aufwendige Synthese definierter Verbindungen - hier Glyzeridverbindungen - voraus. Zum anderen entwickeln sich hier längerkettige Persäuren, deren Reaktivität gegenüber niederkettigen organischen Persäuren vermindert ist. Eingeschränkt ist auch der Temperaturbereich derartiger enzymatischer Systeme, was deren Anwendung als Bleichmittel, beispielsweise bei Voll- und Kaltwaschmitteln begrenzt.

- Bedingt durch die hohe Reaktivität niederkettiger organischer Persäuren, sind solche Verbindungen bevorzugt Reaktionspartner in der Synthese organischer Verbindungen. Die Anwendung von Persäuren war aufgrund der Reaktivität bislang aber auf die laborchemische Synthese beschränkt. Auch die enzymatische Synthese nach US-PS 5,296,161 erlaubt nicht die gezielte Herstellung reaktiver, niederkettiger organischer Persäuren und ist aufgrund der beteiligten, spezifischen Reaktionspartner in ihrem Einsatzbereich bei der Synthese organischer Verbindungen eingeschränkt.

- Aufgabe der Erfindung ist es, in einfacher Weise enzymatisch organische Persäuren herzustellen und eine Mischung als Lieferant aktiven Sauerstoffs für die unterschiedlichsten Anwendungen bereitzustellen.
- 30 Erfindungsgemäß besteht die enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung aus
- Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure

- einer Peroxidquelle und
- einer organischen Säure oder deren Salz,

wobei die Mischung in wässriger Lösung angewandt wird.

Bei flüssiger Form der Mischungskomponenten wird die

- 5 Peroxidquelle getrennt von den anderen Komponenten aufbewahrt.

Dadurch, daß sich das erfindungsgemäße Enzym gefriertrocknen und bei Raumtemperatur auch über längere Zeiten aufbewahren läßt, kann das Enzym z.B. in Verbindung

- 10 mit Natriumacetat und Natriumperborat in einer Feststoffmischung angewandt werden.

Bei Anwendung der erfindungsgemäßen Mischung in wässriger Lösung katalysiert das Enzym die Umwandlung der organischen Säure in Persäure unter Beteiligung der

- 15 Peroxidquelle.

Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme können aus unterschiedlichen Organismen (Pro- und Eukaryonten) isoliert werden. Vorzugsweise wird als Enzym bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase, z. B. Chlorperoxidase oder

- 20 Bromperoxidase unterschiedlicher Herkunftsstämme für die erfindungsgemäße Mischung bzw. das erfindungsgemäße Verfahren angewandt.

Als organische Säure werden vorzugsweise Mono- und Dicarbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren mit 2 bis 4 C-

- 25 Atomen, wie insbesondere Essigsäure, Propionsäure oder Milchsäure bzw. deren Salze eingesetzt. Als Peroxidquelle werden vorzugsweise Wasserstoffperoxid oder Wasserstoffperoxid freisetzende Verbindungen, wie Perborate, insbesondere Natriumperborat, Percarbonate, 30 insbesondere Natriumpercarbonat, und Persulfate genutzt.

Die angewandte Enzymmenge ist abhängig vom Volumen des Gesamtsystems und beträgt vorzugsweise pro 0,15 bis 50 µmol

Wasserstoffperoxid und pro 100 μmol Saure oder Salz 8 bis 16 mU Enzym. Wird statt Wasserstoffperoxid eine andere Peroxidquelle eingesetzt, beispielsweise Natriumperborat, bezieht sich die einzusetzende Menge auf das daraus freigesetzte Wasserstoffperoxid. Die Enzymeinheit U bezeichnet die Enzymmenge, die ein μmol Substrat pro Minute umsetzt.

Der pH-Bereich der erfindungsgemäßen Mischung wird durch die beteiligte organische Säure oder deren Salze im Bereich 3,5 bis 6 gepuffert. Die Anwendungstemperatur der erfindungsgemäßen Mischung kann je nach verwendetem Enzym zwischen 20 und 80 °C liegen.

Die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen besitzen gleiche Strukturmerkmale, nämlich eine α/β -Hydrolase-Faltung und eine katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure. Neben diesen Merkmalen benötigen die angewandten bakteriellen Nicht-Häm-Haloperoxidasen im Gegensatz zu den hämhaltigen Haloperoxidasen keine Häm-Gruppe als prosthetische Gruppe und im Gegensatz zu den eukaryontischen Nicht-Häm-Haloperoxidasen auch keine Metallionen oder andere Co-Faktoren für ihre Aktivität.

Überraschend hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Enzyme durch Hydrolyse eines Serinesters in Verbindung mit Wasserstoffperoxid Persäuren bilden, die dann als oxidierendes Agens wirken. Der Serinester entsteht dabei durch Reaktion der organischen Säure mit einem Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms.

Die erfindungsgemäß verwendeten Oxidoreduktasen sind durch Klonierung der Gene und Überexpression leicht in großen Mengen darstellbar.

Die erfindungsgemäße Mischung läßt sich aufgrund ihrer oxidativen Wirkung verschiedentlich anwenden, z. B. in der

- Synthese organischer Verbindungen, oder generell als Oxidationsreagenz. Ein derartiges Anwendungsgebiet sind Bleichmittel, etwa Bleichmittel für Papier und Textilien, insbesondere für Bleichprozesse im sauren bis neutralen pH-Bereich. Aufgrund der hohen bioziden Wirksamkeit von niederen Percarbonsäuren eignet sich die erfindungsgemäße Mischung auch als Desinfektionsmittel zur Desinfektion von wäßrigen Lösungen und Oberflächen oder zur Herstellung von Desinfektionsmitteln. Als Zusatz in Wasch-, Bleich-, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln angewendet, reagieren die in situ aus der erfindungsgemäßen Mischung gebildeten Persäuren durch Oxidation mit Schmutzstoffen, färbenden Komponenten und Mikroorganismen.

- Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur enzymatischen Herstellung organischer Persäuren so geführt, daß Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, einer organischen Säure oder deren Salze bei einem pH-Wert von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen 15 und 80 °C die Bildung der organischen Persäure katalysieren. Verwendet man in diesem Prozeß Essigsäure, bildet sich in situ als Reaktionsprodukt Peressigsäure, bei Verwendung von Propionsäure oder Milchsäure analog Perpropionsäure oder Permilchsäure.

- Vorzugsweise wird als Enzym bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase, z. B. Chlorperoxidase oder Bromperoxidase, als Peroxidverbindung Wasserstoffperoxid oder Natriumperborat und als organische Säure Essigsäure oder Propionsäure oder Milchsäure oder deren Salze eingesetzt. Der Enzymanteil beträgt vorzugsweise pro 0,15 bis 50 μmol Wasserstoffperoxid und pro 100 μmol Säure oder Salz 8 bis 16 mU Enzym. Wird statt Wasserstoffperoxid Natriumperborat eingesetzt, bezieht sich die einzusetzende Menge auf das daraus freigesetzte Wasserstoffperoxid.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Persäure ist außerordentlich reaktiv. Sie oxidiert Verbindungen oder zersetzt sich unter Bildung von aktivem Sauerstoff und freier Säure. Der aktive Sauerstoff kann
5 damit als Reaktionspartner genutzt werden. Über derartige Oxidationsreaktionen läßt sich auch die in situ gebildete Persäure nachweisen, beispielsweise durch Oxidation von Anilin zu Nitrobenzol. In Gegenwart von Halogenidionen werden diese in situ oxidiert und bei Anwesenheit von für
10 die elektrophile Substitution geeigneten Substraten kommt es zu Halogenierungsreaktionen. Unabhängig dessen, daß sich über die vorgenannten Oxidationsreaktionen die in situ gebildeten Persäuren nachweisen lassen, zeigen diese Beispiele ein vorteilhaftes Anwendungsgebiet des
15 erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Synthese organischer Verbindungen.

Anhand nachfolgender Ausführungsbeispiele, eines beigefügten Sequenzprotokolls mit Aminosäuresequenzen untersuchter Enzyme sowie der Figuren 1 und 2 soll die
20 Erfindung näher erläutert werden. Dabei zeigen:

Fig. 1: dreidimensionale Struktur des Enzyms Bromperoxidase-A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 - Gesamtansicht

25 Fig. 2: Ausschnitt aus der dreidimensionalen Struktur des Enzyms Bromperoxidase-A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762

Enzyme

Folgende Enzyme werden verwandt:

- 30 - Chlorperoxidase aus *Pseudomonas pyrocinia*,
nachfolgend mit CP0-P bezeichnet

- Bromperoxidase A1 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, nachfolgend mit BPO-A1 bezeichnet
 - Bromperoxidase A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, nachfolgend mit BPO-A2 bezeichnet
 - 5 - Chlorperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* TU 24, nachfolgend mit CPO-T bezeichnet
 - Chlorperoxidase aus *Streptomyces lividans*, nachfolgend mit CPO-L bezeichnet
 - Chlorperoxidase aus *Pseudomonas fluorescens*,
10 nachfolgend mit CPO-F bezeichnet
 - Chlorperoxidase aus *Serratia marcescens*, nachfolgend mit CPO-S bezeichnet
 - Acetylcholinesterase aus Zitteraal, nachfolgend mit Ace bezeichnet
- 15 Die Herstellung der Enzyme erfolgt im wesentlichen nach Zellaufschluß und Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation je nach Enzym über Hitzeschritt, Fällung von Fremdproteinen durch pH-Erniedrigung und anschließender Säulenchromatographie an
- 20 unterschiedlichen Medien.

Das Gen der Bromperoxidase A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 sowie auch die Überexpression mit anschließender Reinigung ist im J. Gen. Microbiol. 138, S. 1123-1131 (1992) beschrieben. Die Reinigungen der Bromperoxidasen BPO-A1 und
25 BPO-A2 aus *S. aureofaciens* ATCC 10762 sind in J. Gen. Microbiol. 137, S. 2539-2546 (1992) veröffentlicht.

Die Reinigungen der Chlorperoxidasen von *Streptomyces aureofaciens* TU 24 (CPO-T) und *Pseudomonas pyrocinia* finden sich im Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, S. 1225-1232
30 (1987) bzw. J. Biol. Chem. 263, S. 13725-13732 (1988). Die Klonierung der Gene, die Überexpression und die neuen,

vereinfachten Reinigungsverfahren sind in J. Bacteriol. 170, S. 5890-5894 (1988) bzw. Gene 130, S. 131-135 (1993) beschrieben.

Eine Herstellungsvorschrift für das Enzym CPO-L findet sich in J. of Bacteriology, Vol. 176, S. 2339-2347 (1994). Das Enzym CPO-S wird aus dem Wildstamm isoliert (FEMS Microbiol. Lett. Vol. 129, S. 255-260 (1995)). Das Enzym Ace ist käuflich erwerbbar (Fa. Sigma).

Zur Herstellung des Enzyms CPO-F wurde zur Klonierung des Gens ein synthetisches Oligonukleotid folgender Zusammensetzung verwendet:

TTT	TAT	AAA	GAT	TGG	GG
C	C	G	C		

Dieses Oligonukleotid wurde entsprechend der Angaben des Herstellers mit einem DIG Oligonukleotid 3' - END Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim markiert und mit EcoRI-verdauter Gesamt-DNA aus *Pseudomonas fluorescens* hybridisiert. DNA im hybridisierenden Bereich wurde isoliert und in den Plasmid-Vektor pUC18 ligiert und für die Transformation von *E. coli* TG 1-Zellen verwendet. Ampicillin-resistente *E. coli*-Transformanten wurden mit Hilfe des Oligonukleotids durch Koloniehybridisierung auf Vorhandensein des Chlorperoxidasegens hin untersucht. Der erhaltene Klon enthielt ein 9 kb großes Insert, das mit BamHI/EcoRI-Verdauung zu einem 3.8 kb großen Insert verkleinert wurde. Dieses Fragment wurde ebenfalls in pUC18 ligiert und damit *E. coli* TG1 transformiert. Die resultierenden rekombinanten *E. coli*-Klone enthielten das Plasmid pSK380. Ausgehend von pSK 380 wurde durch Verdauung mit XhoI ein 2,3 kb großes Insert erhalten, das wiederum in pUC18 ligiert wurde (pSK230). *E. coli*-Klone, die das Plasmid pSK 230 enthielten, produzierten erhöhte Mengen an CPO-F. Dazu wurde *E. coli* mit dem Plasmid pSK230 für 24 h gezüchtet, die Zellen durch Zentrifugation geerntet und

durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Ammoniumsulfatfällung (35 - 55 % Sättigung) wurde die Proteinlösung langsam auf 55 °C erhitzt, dann auf Eis gekühlt und ausgefallenes Protein durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Lösung auf einen Proteingehalt von 5 mg/ml eingestellt und mit 1/100 Volumen einer Trypsinlösung (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Ultrafiltration (YM30-Membran) wurde die Proteinlösung auf eine mit 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5, equilibrierte DEAE-Sephacel-Säule (10 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0 - 0,6 M in 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5 (10 ml). Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und durch Ultrafiltration konzentriert. Die Proteinlösung wurde dann auf eine Sephacryl S 300-Säule, equilibriert mit 0,1 M Ammoniumacetat, pH 6,8, aufgetragen und fraktioniert. Die aktiven Fraktionen werden gesammelt und bei -20 °C gelagert.

Das Sequenzprotokoll zeigt die Aminosäuresequenzen der Enzyme CPO-P, BPO-A1, BPO-A2, CPO-T, CPO-L und CPO-F. Die Aminosäuresequenzen wurden von den nach der Kettenabbruchmethode erhaltenen DNA-Sequenzen abgeleitet.

Sichtbar ist, daß die Aminosäuresequenzen der dargestellten Enzyme an gleicher Stelle gleiche Aminosäuren, nämlich die Aminosäuren Serin (Ser), Histidin (His) und Asparaginsäure (Asp) aufweisen. Diese Aminosäuren bilden die katalytische Triade der Enzyme.

Fig. 1 zeigt in Gesamtansicht eine dreidimensionale Struktur des Enzyms Bromperoxidase-A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, die durch Röntgenstrukturanalysen erhalten wurde (Hecht et. al, Nature Struct. Biol. 1, S. 532-537 (1994)).

In Fig. 2 ist ein Ausschnitt der dreidimensionalen Struktur des Enzyms BPO-A2 dargestellt. Das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade, bestehend aus Serin (Ser 101A), Histidin (His 264A) und Aspartat (Asp 235A), ist deutlich zu erkennen. Zusätzlich sind in Fig. 2 angegeben: Met 102A, Tyr 76A und Trp 211A.

Ausführungsbeispiel 1

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung unter
10 Beteiligung von Chlorperoxidase

Die Mischung besteht aus

- 0,5 mg Chlorperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens*
TU 24 gelöst in Wasser
- 4 ml 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,0 und
- 15 - 15,7 µl (152 µmol) H₂O₂ (30%ig).

Vor Reaktion wird die Wasserstoffperoxidlösung getrennt von den anderen Komponenten gelagert. Diese Mischung soll nachfolgend für die Oxidation von Thioanisol zum entsprechenden Sulfoxid verwendet werden.

- 20 Dazu werden zu 4 ml 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,0 und 1 ml 1,4-Dioxan 11,8 µl Thioanisol und 15,7 µl H₂O₂ 30%ig gegeben. Dieser Lösung werden 0,5 mg Chlorperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* TU 24 zugefügt und die Reaktion für 78 min bei 22 °C inkubiert. Als alleiniges Produkt
25 wurde zu 100 % das Sulfoxid erhalten.

Ausführungsbeispiel 2

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung unter Beteiligung von Bromperoxidase

Die Mischung besteht aus

- 1 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5
- 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung
- 0,3 µg Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762.

5 Bis zur Reaktion wird die Wasserstoffperoxidlösung getrennt von den anderen Mischungskomponenten gelagert. Anhand einer Bromierungsreaktion von Monochlordimedonlösung soll die Anwendung der vorbenannten Mischung beschrieben werden:

Dazu werden zu 1 ml 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 10 µl 4,8
10 mM Monochlordimedonlösung in Ethanol und 100 µl 0,03 %
H₂O₂-Lösung gegeben. Dieser Lösung werden 0,3 µg
Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762
sowie 100 µl 1 M Natriumbromidlösung zugefügt.

In dieser Lösung katalysiert die Bromperoxidase die
15 Umwandlung von Natriumacetat in Peressigsäure. Die gebildete Peressigsäure reagiert dann weiter mit dem Natriumbromid. Dadurch wird das Bromidion oxidiert und es kommt zur vollständigen Bromierung des eingesetzten Monochlordimedons innerhalb von 10 min.

20 Ausführungsbeispiel 3

Enzymatisch, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung unter Beteiligung von Chlorperoxidase

Die Mischung besteht analog Ausführungsbeispiel 2 aus

- 1 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5
- 25 - 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung
- 0,3 µg Chlorperoxidase aus *Pseudomonas pyrrycinia*.

Bis zur Reaktion werden die Mischungskomponenten getrennt voneinander gelagert. Analog Ausführungsbeispiel 2 wird

diese Mischung zur Bromierung einer Monochlordimedonlösung angewandt.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Abhängigkeit der bromierenden Aktivität der Chlorperoxidase aus *Pseudomonas pyrrrocinia* von der Temperatur aufgeführt:

Tabelle 1

	°C	% Aktivität
10	20	30
	30	50
	40	70
	50	90
	60	100
15	70	50

Tabelle 1 zeigt die Enzymaktivität über einen weiten Temperaturbereich, wobei bei 40 bis 70 °C gute und bei 60 °C die besten Ergebnisse erzielt werden.

20 Ausführungsbeispiel 4

Bromierung von Monochlordimedon mit einer enzymatischen, aktiven Sauerstoff liefernden Mischung unter Verwendung von Enzymen unterschiedlicher Herkunft

Analog Ausführungsbeispiel 2 wird jeweils eine Mischung aus

25 - 1 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5

- 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung und
- 10 mU Enzym CPO-P, CPO-T, BPO-A1, BPO-A2, CPO-F, CPO-L, CPO-S bzw. Ace hergestellt.

5 Bis zur Reaktion wird die Wasserstoffperoxidlösung getrennt von den anderen Mischungskomponenten gelagert. Anhand einer Bromierungsreaktion von Monochlordimedonlösung soll die Anwendung der vorbenannten Mischung beschrieben werden:

- Dazu werden zu 1 ml 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 10 µl 4,8 mM Monochlordimedonlösung in Ethanol und 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung gegeben. Dieser Lösung werden 10 mU Enzym sowie 100 µl 1 M Natriumbromidlösung zugefügt.

- Anhand der Bromierungsreaktion von Monochlordimedon zu Monobrommonochlordimedon wird die Aktivität der enzymatischen Mischung bestimmt. Dabei wird Bromid durch 15 die enzymatisch gebildete Persäure oxidiert und reagiert dann mit dem organischen Substrat Monochlordimedon. Hierbei führt ein mol Persäure zur Bromierung eines mols Monochlordimedon. Die Enzyme zeigen je nach Herkunft unterschiedliche spezifische Aktivitäten:

20	Enzym	spez. Aktivität (unit/mg Protein)
	CPO-P	63
	CPO-T	9
	BPO-A1	45
	BPO-A2	15
25	CPO-F	4
	CPO-L	19
	CPO-S	390
	Ace	0,013

Ausführungsbeispiel 5

Verfahren zur Herstellung von Peressigsäure

19 µg Chlorperoxidase werden in 1 ml 1M Natriumacetat, pH
5 4,0 gelöst und mit 5 µl 30 % H₂O₂-Lösung versetzt und für
50 min. bei 30 °C inkubiert. Die dabei entstehende
Peressigsäure wird anhand der Oxidationsreaktion von
2-Chloranilin zu 2-Nitrochlorbenzol nachgewiesen.

Nachfolgende Tabellen geben Reaktionsergebnisse bei
10 unterschiedlichen Mengen der Reaktionspartner Acetat und
Wasserstoffperoxid wieder.

Tabelle 2:

2-Nitrochlorbenzolbildung in Abhängigkeit von
unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen

15

	H ₂ O ₂ -Anteil	Reaktionsprodukt
	110 mM H ₂ O ₂	95 ng 2-Nitrochlorbenzol
	176 mM H ₂ O ₂	160 ng 2-Nitrochlorbenzol
20	220 mM H ₂ O ₂	200 ng 2-Nitrochlorbenzol
	330 mM H ₂ O ₂	230 ng 2-Nitrochlorbenzol
	440 mM H ₂ O ₂	240 ng 2-Nitrochlorbenzol

Tabelle 3:
2-Nitrochlorbenzolbildung in Abhängigkeit von
unterschiedlichen Acetatkonzentrationen

5	Acetat-Konzentration	Reaktionsprodukt
	20 mM Acetat	30 ng 2-Nitrochlorbenzol
	100 mM Acetat	120 ng 2-Nitrochlorbenzol
	200 mM Acetat	180 ng 2-Nitrochlorbenzol
10	500 mM Acetat	240 ng 2-Nitrochlorbenzol
	1000 mM Acetat	240 ng 2-Nitrochlorbenzol

Die oben aufgeführten Tabellen zeigen eine Abhängigkeit
15 sowohl von der Konzentration von Wasserstoffperoxid als
auch von Acetat. Acetatgehalte bis zu 500 mM führen zu
erhöhter Persäureproduktion.

Patentansprüche

1. Enzymatische, aktiven Sauerstoff bildende Mischung in trockener oder flüssiger Form, dadurch gekennzeichnet,
5 daß die Mischung aus
 - Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure,
 - einer Peroxidquelle und
 - 10 - einer organischen Säure oder deren Salz besteht,und in wässriger Lösung angewandt wird.
2. Mischung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung aus
 - 15 - in Wasser gelöster Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure,
 - Peroxidlösung
 - 20 - einer wässrigen Lösung einer organischen Säure oder deren Salz besteht,wobei bis zur Anwendung dieser Mischung die Peroxidlösung getrennt von den anderen Komponenten aufbewahrt wird.
- 25 3. Mischung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Oxidoreduktase bakterielle Nicht-Ham-Haloperoxidase, als organische Säure Essigsäure oder Propionsäure oder Milchsäure oder deren Salze und als
30 Peroxidquelle Wasserstoffperoxid oder Natriumperborat eingesetzt werden.

4. Mischung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß als bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase
Chlorperoxidase oder Bromperoxidase eingesetzt werden.
5. Mischung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Anteil Oxidoreduktase pro 0,15 bis 50 µmol
Wasserstoffperoxid und pro 100 µmol Säure oder deren
Salz 8 bis 16 mU beträgt.
6. Mischung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Anteil Oxidoreduktase bei Einsatz von
Natriumperborat 8 bis 16 mU pro 0,15 bis 50 µmol in
Lösung freigesetztem Wasserstoffperoxid beträgt.
7. Verfahren zur Herstellung von organischen Persäuren,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Anwesenheit von Oxidoreduktase mit einer α/β -
Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus
den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure und
Wasserstoffperoxid oder Peroxidverbindungen organische
Säuren oder deren Salzen in wässriger Lösung bei einem
pH-Wert von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen
15 und 80 °C zu organischen Persäuren umgewandelt
werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Oxidoreduktase bakterielle Nicht-Häm-
Haloperoxidase, als Peroxidverbindung Natriumperborat
und als organische Säure Essigsäure oder Propionsäure
oder Milchsäure oder deren Salze eingesetzt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß als bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase
Chlorperoxidase oder Bromperoxidase eingesetzt werden.
- 5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß pro 0,15 bis 50 μmol Wasserstoffperoxid und pro 100
 μmol Säure oder Salz 8 bis 16 mU Nicht-Häm-
Haloperoxidase eingesetzt werden.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei Einsatz von Natriumperborat 8 bis 16 mU
Oxidoreduktase pro 0,15 bis 50 μmol in Lösung
freigesetztem Wasserstoffperoxid eingesetzt werden.

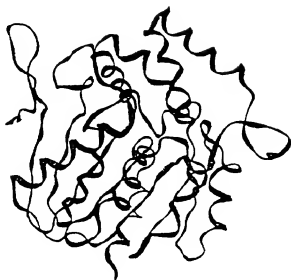


Fig. 1

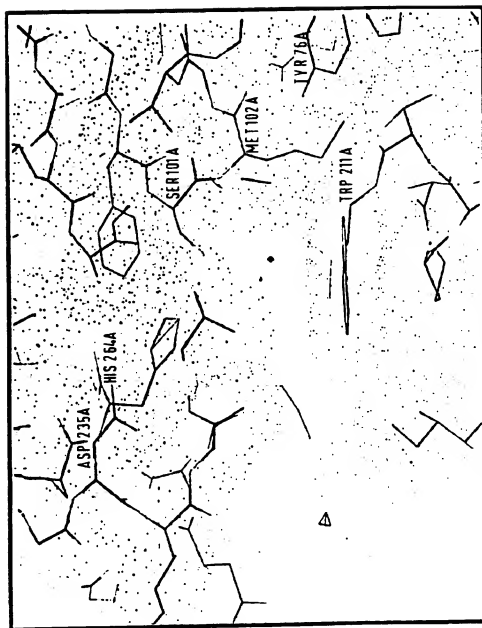


Fig. 2